

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ЖИДКОСТИ ПУЗЫРЯ
ESCHINOCOCCUS GRANULOSUS

В. А. Пинчук

Украинский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии, Харьков

Описаны результаты иммунодиффузионного изучения антигенной структуры эхинококковой жидкости и ее сравнительный анализ с другими гельминтами. Рассмотрены вопросы о наличии стадийспецифических антигенов у личиночной и взрослой форм эхинококка и хозяино-паразитной антигенной общности у этого гельминта.

Широкое распространение эхинококкоза среди сельскохозяйственных животных, огромный экономический ущерб, причиняемый этим зоонозом, а также невозможность использования обычных методов гельминтологической диагностики для его распознавания побудили ряд исследователей приступить к разработке и усовершенствованию различных иммунологических реакций при этом заболевании. Чаще всего в ветеринарии применяют внутрикожную аллергическую пробу. Однако даже в отношении этой реакции в литературе имеется много противоречивых данных относительно ее чувствительности и специфичности. Отмечают, что она нередко бывает положительной у животных, зараженных финнозом, тонкошейным цистицеркозом и другими гельминтозами. Многие авторы объясняют это явление недостаточной специфичностью используемых в реакции антигенов. Ими обычно служат различные препараты — от неразведенной жидкости до сложных экстрактов из оболочек и сколексов эхинококкового пузыря.

Как показали исследования Каган (Kagan, 1963), Чорди и Каган (Chordi and Kagan, 1965), Новосельской (Novoselska, 1965), такие антигены являются сложными, многокомпонентными системами. Изучение их свойств и состава, выделение высокочувствительных специфических фракций имеет первоочередное значение в проблеме иммунодиагностики этого гельминтоза. Поэтому целью настоящей работы являются исследование антигенного спектра жидкости эхинококкового пузыря и его сравнительный анализ с другими гельминтами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Приготовление антигенов и гипериммунных сывороток. Жидкость из сколексодержащих эхинококковых пузырей, локализующихся в печени, собирали на мясокомбинате от пораженного эхинококкозом крупного рогатого скота и диализовали в течение 2 суток сначала против проточной, а затем дистиллированной воды. Одну часть ее замораживали и лиофилизировали, а другую концентрировали в 60 раз выпариванием в вакууме при комнатной температуре, консервировали мертиолатом и хранили при 2—4°.

Оболочки, сколексы, половозрелую форму *E. granulosus*, имагинальные стадии *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceatum* и других используемых в работе гельминтов получали от больных животных, измельчали механи-

ческим путем при низкой температуре, экстрагировали в боратном буфере с рН 8.6 и ионной силой 0.05 в течение суток и центрифугировали 1 час при 6000 об./мин. Надосадочную жидкость диализовали против этого же буфера в течение 2 суток, лиофилизировали и использовали в качестве антигенов.

Гипериммунные сыворотки были получены от кроликов, иммунизированных жидкостью эхинококкового пузыря с адьювантом Фрейнда. Всего в работе использовано 10 антисывороток. Для выяснения антигенной общности эхинококковой жидкости с изучаемыми гельминтами полученные сыворотки истощали путем адсорбции неспецифических антител гетерологичными антигенами по способу Зильбера и Абелева (1962), добавляя к ним экстракты из различных гельминтов. Смесь помещали в термостат при 37° на 6 час., а затем на 1 сутки в холодильник при 2—4°. Выпавший преципитат удаляли центрифугированием, а надосадочную жидкость использовали в реакциях. Полнота истощения сывороток контролировалась реакцией Оухтерлони.

Антигенную структуру эхинококковой жидкости изучали при помощи реакций иммуноэлектрофореза и диффузионной преципитации в геле, которые проводились по общепринятой методике с использованием 1%-го агара Дифко на боратном буфере с рН 8.6, ионной силой 0.05.

Изучаемые антигены подвергали электрофоретическому разделению в течение 6 час. при силе тока 30 ма, а затем полученные электрофореграммы в зависимости от назначения опыта либо проявляли антисыворотками, либо окрашивали амидо-черным по методике, описанной Грабаром и Буртенем (1963). Учет реакции иммуноэлектрофореза проводился на 4—5-й день. Полученные полосы преципитации фотографировали или зарисовывали. Каждый опыт повторялся несколько раз. Содержание общего азота в эхинококковой жидкости определяли по Фолину и Гулику, а углеводов — по Хагедорну-Иенсену.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследуемая эхинококковая жидкость имела удельный вес 1.017 и содержала 1.83% плотного остатка, 96 мг% азота и 70 мг% углеводов в пересчете на глюкозу.

Посредством электрофореза в агаровом геле протеины эхинококковой жидкости, концентрированной выпариванием и лиофилизацией, были разделены на 3 компонента. Сравнивая их электрофоретическую подвижность с подвижностью нормальной сыворотки крови крупного рогатого скота, удалось установить идентичность этих протеинов с альбуминовой, α - и β -глобулиновой и γ -глобулиновой фракциями.

После элюции протеинов 2%-м раствором углекислого натрия в 50%-м метаноле оказалось, что альбуминная фракция составляет 67%, комбинированные α - и β -глобулины — 21 и γ -глобулины — 12%.

Имуноэлектрофоретическое изучение эхинококковой жидкости позволило выявить в ней 13 антигенных компонентов (рис. 1). Для удобства они были пронумерованы нами в зависимости от их расположения относительно катода от 1 до 13. В наших опытах характер иммуноэлектрофореграмм не зависел от способа получения антигена, поэтому нами было отдано предпочтение лиофилизированной эхинококковой жидкости, так как ее легче готовить, стандартизировать и хранить.

Т к а н е с п е ц и ф и ч е с к и е а н т и г е н ы у *E. granulosus*. Сравнительным анализом водно-солевых экстрактов из оболочек, сколексов и жидкости эхинококкового пузыря выявлена тесная антигенная общность между ними. На рис. 2 показаны результаты взаимодействия антисыворотки и жидкости *E. granulosus*, помещенной в центральную лунку, с антигенами из жидкости (лунки 1 и 2), оболочек (лунки 3 и 4) и сколексов (лунки 7 и 8) этого гельминта.

Антиэхинококковая сыворотка с гомологичным антигеном формирует свыше 10 полос преципитации, а с оболочками и сколексами — 8—9 ли-

ний. Каждая из этих линий соединяется с соответствующей полосой эхинококковой жидкости в общий фронт, общую дугу преципитации, что свидетельствует об идентичности антигенных компонентов, образующих эти полосы.

Следует отметить, что каждая из исследуемых тканей включает в свой состав строго индивидуальные антигенные фракции. На рис. 2 хорошо

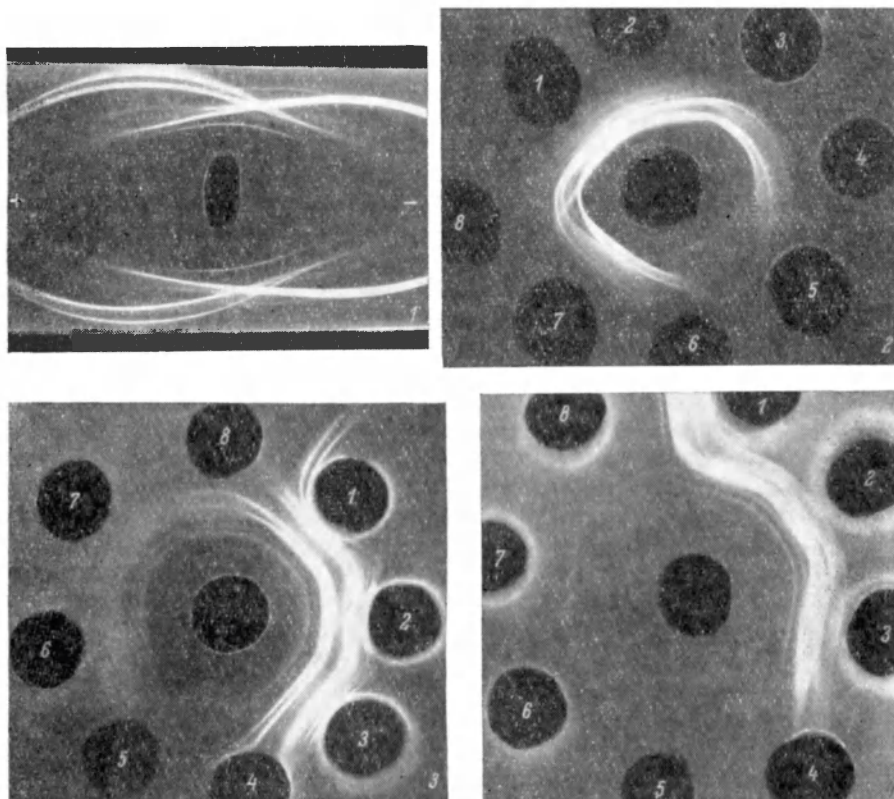


Рис. 1. Иммуноэлектрофореграмма эхинококковой жидкости.

Рис. 2. Сравнительный анализ антигенов из жидкости (лунки 1, 2), оболочек (лунки 3, 4), сколексов (лунки 7, 8) и имагинальной формы (лунки 5, 6) *E. granulosus* с антисывороткой к эхинококковой жидкости (центральная лунка).

Рис. 3. Реакция Оухтерлони эхинококковой жидкости (центральная лунка) с нативной (лунки 1—3) и истощенной экстрактом из оболочек эхинококкового пузыря (лунки 6, 8) антисывороткой и жидкости *E. granulosus*.

Рис. 4. Реакция Оухтерлони эхинококковой жидкости (центральная лунка) с нативной (лунки 1—3) и истощенной сывороткой крупного рогатого скота (лунки 6—8) и антиэхинококковой сывороткой.

видны пять четко различимых полос преципитации, формируемых анти-эхинококковой сывороткой и гомологичным антигеном и образующих прямые линии, упирающиеся в лунки с антигенами из оболочек и сколексов. Это свидетельствует об отсутствии подобных компонентов в изучаемых тканях.

Полученные нами данные были неоднократно подтверждены реакциями иммуноэлектрофореза и Оухтерлони с нативными и истощенными антисыворотками. В частности, на рис. 3 показано, что антисыворотка к эхинококковой жидкости, помещенная в лунки 1—3, с гомологичным антигеном формирует обширный спектр преципитации (свыше 10 полос), и та же сыворотка, но предварительно истощенная вытяжкой из оболочек эхинококкового пузыря (лунки 6—8), образует лишь 5 линий преципитации.

Стадиоспецифические антигены у *E. granulosus*. На первом этапе исследования, посредством реакции двойной диффузии в геле, нами проводился сравнительный анализ экстрактов из различных тканей эхинококкового пузыря и взрослых паразитов с использованием антисыворотки к эхинококковой жидкости. Уже это позволило выявить существенное различие в антигенном комплексе личиночных и половозрелых эхинококков. Между антисывороткой к эхинококковой жидкости и вытяжкой из стробилы эхинококков (рис. 2), помещенной в лунки 5 и 6, отчетливо заметны 3 полосы преципитации, которые формируются между антисывороткой и всеми участвующими в реакции экстрактами и являются общими для них. Опытами, проведенными методом иммуноэлектрофореза, реакцией двойной диффузии в геле с антиэхинококковой сывороткой, истощенной экстрактом из взрослого паразита, эти выводы были подтверждены.

Установленное нами различие антигенного спектра личиночной и половозрелой стадий эхинококка подтверждает ранее высказанное предположение Шульца и Андреевой (1954) о существовании у паразита мышей стробилоцерка трех, стадийно различных антигенов. Оно согласуется с исследованиями Кравцова (1967), изучавшего стадиоспецифические антигены у имагинальной и личиночной формы *Spirometra erinacei*, а также данными, полученными в лаборатории профессора Е. С. Лейкиной. Сотрудники этой лаборатории (Баллад и Соколовская, 1968) выявили существенные различия в антигенном комплексе онкосфер, личиночной и половозрелой стадий бычьего цепня. Ими установлено, что антигенный комплекс цистицерка включает в свой состав 2 компонента, отсутствующих у онкосфер, и 3, отсутствующих у стробилы паразита. У последней в свою очередь обнаружены 4 антигена, которые отсутствовали у цистицерка.

Вышеизложенное показывает, что в иммунологических реакциях наиболее активными и высокочувствительными будут антигены, приготовленные из тканей, стадийно соответствующих фазе гельминта, которую они должны выявить.

Х о з я и н о - п а р а з и т н а я а н т и г е н н а я о б щ н о с т ь у э х и н о к о к к о в изучалась сравнением в реакциях иммуноэлектрофореза и Оухтерлони антигенов из эхинококковой жидкости и сыворотки крови крупного рогатого скота, не зараженного эхинококком.

Во всех опытах исходная антиэхинококковая гипериммунная сыворотка давала большое число полос, тождественных как с гомологичным антигеном, так и с сывороткой крови. Однако помимо общего спектра преципитации постоянно отмечалась дополнительная полоса с гомологичным антигеном. Мы предположили, что антиген, ответственный за ее образование, имеет паразитарное происхождение. Для доказательства этого были поставлены опыты с истощенными антисыворотками. Оказалось, что с гомологичным антигеном они формировали лишь одну полосу преципитации в отличие от нативных, образующих с этим же антигеном, как уже отмечалось, 13 полос. Рис. 4 подтверждает вышесказанное. На нем видно, что нативная антиэхинококковая сыворотка, помещенная в лунки 1—3, и гомологичный антиген (центральная лунка) образуют обширный спектр преципитации, а истощенная сывороткой крови крупного рогатого скота (лунки 6—8) — лишь одну полосу. В данном случае для нейтрализации неспецифических антител в антиэхинококковой сыворотке истощающий антиген брался в избытке, поэтому между лунками 1 и 8 формируется ряд полос преципитации за счет взаимодействия нативной антиэхинококковой сыворотки и истощающего антигена.

Хорошо видно, что с этим антигеном провзаимодействовал весь комплекс антител антиэхинококковой сыворотки, за исключением одного, возникающего в ответ на раздражение специфическим и характерным для эхинококковой жидкости антигеном.

Несколько ранее Чорди и Каган (Chordi and Kagan, 1965) и Новосельская (Novoselska, 1965) выявили общие антигены в оболочках, жидкости и сколексах эхинококкового пузыря и в различных тканях человека и

животных. Капрон с соавторами (Capron et al., 1965) обнаружили такие антигены у взрослой *Schistosoma mansoni* и дефинитивного хозяина-хомяка, у церкарий этого гельминта и промежуточного хозяина-моллюска *Austro-lorbis glabratus* Ченг (Cheng, 1965), применяя хроматографические методы, указал на очень близкое качественное содержание аминокислотного состава моллюсков и церкарий *S. mansoni*. На этом основании он пришел к выводу, что изучаемые им личиночные формы трематод извлекают аминокислоты и протеины из сыворотки крови хозяина и прямо или косвенно используют их.

Это подтверждает предположение Дамиант (Damiant, 1962) о наличии в организме паразита и реципиента так называемых затененных антигенов. По его мнению, такие антигены настолько одинаковы, что не являются для реципиента чужеродными, а поэтому в обычных условиях не вызывают образования антител при поступлении их в организм хозяина.

Однако у людей и животных, не зараженных эхинококком, но страдающих различными коллагенозами и другими заболеваниями, при которых вырабатываются аутоантитела против собственных тканей организма, могут наблюдаться положительные реакции на эхинококковый антиген за счет взаимодействия таких антител с антигенным комплексом эхинококковой жидкости, общим для хозяина. Так, Альперович (1967) при постановке реакции Казони установил, что у больных циррозом печени, раком она положительна в 15—18% случаев. Учитывая изложенное, нам кажется весьма уместным предложение Каган (Kagan, 1963) об использовании в иммунологических реакциях эхинококковой жидкости, полученной от животных другого вида, так как это должно способствовать сокращению ложноположительных проб такого происхождения.

Изучение антигенной общности эхинококковой жидкости с другими гельминтами. Сравнительным иммунофоретическим анализом эхинококковой жидкости и вытяжек из различных гельминтов было установлено наличие общих антигенных компонентов между ними. В таблице приведены результаты иммуноэлектрофореза этих антигенов с антиэхинококковой гипериммунной сывороткой. Из ее данных видно, что фракции, общие между эхинококковой жидкостью и каждым видом гельминтов, в отдельности немногочисленны, но различны: для фасциол и дикроцелий — 1, мониезий — 2, бычьих цистицерков, жидкости тонкошейных финн — 4, оболочек этого паразита — 5.

В общей сложности из 13 антигенных компонентов, входящих в состав эхинококковой жидкости, 7 оказались общими для различных гельминтов. Из них особенно следует отметить фракции, ответственные за формирование полосы 9, общей почти для всех изучаемых гельминтов, и полос 1 и 8, являющихся по крайней мере в количественном отношении основными в антигенном комплексе эхинококковой жидкости и входящих в состав экстрактов из *Cysticercus bovis* и *C. tenuicollis*.

Результаты сравнительного иммуноэлектрофоретического анализа эхинококковой жидкости и других гельминтов

Гельминт	Номер фракции эхинококковой жидкости												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Fasciola hepatica</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Moniezia expansa</i>	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Dicrocoelium lanceatum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Cysticercus bovis</i>	+	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>C. tenuicollis</i> (жидкость)	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
<i>C. tenuicollis</i> (оболочки)	+	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—

Примечание. Знак плюс — фракции эхинококковой жидкости, общие с другими гельминтами; минус — фракции, отсутствующие у них.

Как показал анализ, эхинококковая жидкость включает в свой состав больше антигенных компонентов, общих с гельминтами, относящимися к одному классу (от 2 до 5 фракций у цестод). И, напротив, их число значительно меньше по сравнению с гельминтами, далеко отстоящими в таксономическом отношении (одна фракция у трематод).

Несмотря на присутствие в антигенном комплексе эхинококковой жидкости фракций, общих для различных гельминтов, она обладает сравнительно высокой антигенной индивидуальностью. В наших опытах выявлено 6 фракций (4, 6, 7, 11—13), специфичных только для эхинококка.

Получение таких фракций в чистом виде и использование их в качестве антигенов должны, по нашему мнению, свести к минимуму неспецифические реакции и тем самым превратить иммунологические пробы в надежный способ прижизненной диагностики эхинококкоза у животных.

ВЫВОДЫ

1. Иммуноэлектрофорезом в агаровом геле установлено, что эхинококковая жидкость имеет сложный состав и включает тканеспецифические, стадиоспецифические и общие для хозяина и различных гельминтов антигены.

2. Из 13 фракций, выявленных в эхинококковой жидкости, 6 оказались специфическими, а 7 — общими для различных гельминтов.

3. Выделение специфических фракций в чистом виде и использование их в качестве антигенов должны значительно повысить специфичность иммунологических реакций и превратить их в надежный способ распознавания эхинококкоза у животных.

Литература

- Альперович Б. И. 1967. Альвеококкоз. Якутск : 1—63.
- Баллад Н. Е. и Соколовская Ю. М. 1968. Выявление общих и специфических антигенных компонентов у *Cysticercus bovis*, *S. cellulosae*, *Taenia hydatosa*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 37 (2) : 193—198.
- Грабар П. и Буртен П. 1963. Иммуноэлектрофоретический анализ. М. : 47—49.
- Зильбер Л. А. и Абелев Г. И. 1962. Вирусология и иммунология рака. М. : 224—233.
- Кравцов Э. Г. 1967. Сравнение антигенной структуры имагинальной фазы и плероцеркоидов *Spirometra erinacei*. Паразитол., 1 (5) : 435—439.
- Шульц Р. С. и Андреева Н. К. 1954. О некоторых закономерностях иммунитета при гельминтозах. Тр. Инст. ветеринарии Каз. фил. ВАСХНИЛ, 6 : 468—491.
- Capron A., Biguet J., Rose G. et Vernes A. 1965. Les antigenes de *Schistosoma mansoni*. Ann. Inst. Pasteur, 109 (5) : 188—202.
- Cheng T. C. 1963. Biochemical requirements of larval Trematodes. Ann. N. Y. Acad. Sci., 113 : 289—321.
- Chordi A. and Kagan I. G. 1965. Identification and characterization of antigenic components of Sheep Hydatid Fluid by immunoelectrophoresis. J. Parasitol., 51 (1) : 63—71.
- Damiant R. T. 1962. A theory of immunoselection for eclipsed antigens of parasites and its implications for the problem of antigenic polymorphism in man. J. Parasitol., 48 (2) : 16.
- Kagan I. G. 1963. Hydatid disease. Exp. Parasitol., 13 (1) : 57—71.
- Novoselska L. 1960. Comparative studies of the antigens of the hydatid membrane and some organ antigens. Научн. тр. Высш. мед. инст., София, 44 (3) : 1—6.

ANTIGENIC STRUCTURE OF THE LIQUID OF CYSTS OF ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

V. A. Pinchuk

SUMMARY

The antigenic structure of *Echinococcus* liquid was studied by means of immunodiffusion technique. It was established that the liquid is complex and involves 13 antigenic components. Among them there are antigenes specific to tissues and stages and antigenes common to the blood serum of the intermediate host and various helminths.